



Judith Köhler (Autor)

# Entwicklung eines Screening-Systems zur Identifizierung und Evaluierung herbizidtoleranter 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenasen (HPPDs)

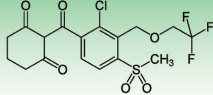
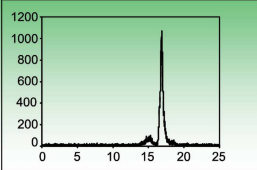
UNIVERSITÄT HOHENHEIM  
SCHRIFTENREIHE ZUR PHYSIOLOGIE UND  
BIOTECHNOLOGIE DER PFLANZEN



Judith Köhler

Entwicklung eines Screening-Systems zur Identifizierung  
und Evaluierung herbizidtoleranter 4-Hydroxyphenylpyruvat  
Dioxygenasen (HPPDs)

A. Schaller (Herausgeber) - Band 5



 Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6452>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	i
Abkürzungsverzeichnis .....	vii
Zusammenfassung .....	xi
Summary.....	xiii
1 Einleitung .....	1
1.1 Herbizide in der modernen Landwirtschaft .....	1
1.2 Herbizidale HPPD-Inhibitoren und deren Zielprotein, die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase .....	3
1.3 Bestehende Testsysteme zur Identifizierung und Evaluierung von HPPD-Inhibitor toleranten HPPDs .....	8
1.4 Das Testsystem Pflanze: Evaluierung von HPPD-Inhibitortoleranz im Zielorganismus .....	10
1.5 Photosynthetische Modellorganismen .....	13
1.5.1 Die Grünalgen <i>Chlorella vulgaris</i> und <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	14
1.5.2 Das Laubmoos <i>Physcomitrella patens</i> .....	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	18
2 Material und Methoden .....	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.2 Chemikalien und Kits .....	21
2.1.3 Herbizide .....	21
2.1.4 Biologisches Material .....	22
2.1.4.1 Bakterien.....	22
2.1.4.2 Grünalgen und Cyanobakterien .....	22
2.1.4.3 Laubmoos .....	22
2.1.5 Enzyme .....	23
2.1.6 Oligonukleotide .....	23
2.1.7 Vektoren .....	23
2.1.7.1 Kommerzielle Vektoren .....	23
2.1.7.2 DNA-Konstrukte .....	23
2.1.8 Verwendete Software und Datenbanken .....	24
2.1.8.1 DNA- und Proteinsequenzen.....	24
2.1.8.2 Auswertung von Wachstumsanalysen und statistische Auswertungen .....	24
2.2 Allgemeine Methoden .....	25



## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.1	Kultivierung und Transformation von Bakterien.....	25
2.2.2	Kultivierung von photosynthetisch aktiven Organismen.....	25
2.2.2.1	Kultivierung der Grünalgen <i>C. reinhardtii</i> und <i>C. vulgaris</i> .....	26
2.2.2.2	Kultivierung von <i>S. leopoliensis</i> .....	26
2.2.2.3	Kultivierung und Transformation von <i>P. patens</i> .....	26
2.2.2.3.1	Kultivierung .....	26
2.2.2.3.2	Transformation.....	27
2.2.3	Dosiswirkungsversuche an photosynthetisch aktiven Organismen .....	30
2.2.3.1	Dosiswirkungsversuche mit HPPD-Inhibitoren und weiteren Substanzen an <i>C. reinhardtii</i> .....	31
2.2.3.2	Dosiswirkungsversuche mit HPPD-Inhibitoren an <i>C. vulgaris</i> .....	31
2.2.3.3	Dosiswirkungsversuche mit HPPD-Inhibitoren an <i>S. leopoliensis</i> .....	32
2.2.3.4	Dosiswirkungsversuche mit HPPD-Inhibitoren an verschiedenen Gewebetypen von <i>P. patens</i> .....	32
2.2.3.4.1	Dosiswirkungsversuche mit Herbiziden an Protonema .....	32
2.2.3.4.2	Dosiswirkungsversuche mit Herbiziden an Gametophyten .....	33
2.2.3.4.3	Dosiswirkungsversuche mit Herbiziden an Protoplasten.....	33
2.2.4	Generierung einer tembotrionsensitiven <i>C. reinhardtii</i> -Mutante durch EMS- Mutagenese .....	34
2.2.5	Applikationsversuche mit isotopenmarkiertem Tembotrion an photosynthetisch aktiven Organismen .....	35
2.2.5.1	<sup>14</sup> C-Tembotrionapplikation an <i>C. reinhardtii</i> .....	35
2.2.5.2	<sup>14</sup> C-Tembotrionapplikation an <i>P. patens</i> .....	36
2.2.5.2.1	Radio-chemische Analysen mittels Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie .....	37
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	38
2.3.1	Isolation und Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	38
2.3.1.1	Isolation von Plasmid-DNA.....	38
2.3.1.2	Isolation von genomischer DNA aus <i>P. patens</i> .....	38
2.3.1.3	Isolation von RNA aus <i>P. patens</i> .....	38
2.3.1.4	cDNA-Synthese.....	38
2.3.1.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	39
2.3.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	39
2.3.2.1	Amplifikation.....	39
2.3.2.2	Restriktionsanalysen .....	40
2.3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese (qualitativ und präparativ).....	40



## Inhaltsverzeichnis

---

2.3.2.4	Dephosphorylierung und Ligation.....	40
2.3.2.5	Sequenzierung .....	41
2.3.3	Vektorkonstruktion.....	41
2.3.3.1	Klonierung von <i>PpHpd1</i> und <i>PpHpd2</i> aus <i>P. patens</i> .....	41
2.3.3.2	<i>P. patens</i> -Transformationskonstrukte.....	41
2.3.3.2.1	Herstellung des Basiskonstrukts PpBV-1.....	42
2.3.3.2.2	Herstellung des Basiskonstrukts PpBV-2.....	42
2.3.3.2.3	<i>P. patens</i> -Transformationsvektoren mit zwei Targetsequenzen .....	43
2.3.3.2.4	<i>P. patens</i> -Transformationsvektoren mit einer Targetsequenz.....	43
2.4	Proteinbiochemische Methoden .....	45
2.4.1	Proteinexpression und -aufreinigung aus <i>E. coli</i> .....	45
2.4.2	Proteinaufreinigung aus <i>P. patens</i> .....	45
2.4.3	Auftrennung von Proteinen mittels Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese .....	46
2.4.4	Western Blot zur immunologischen Proteindetektion.....	46
2.4.5	Enzymaktivitätstest mit und ohne HPPD-Inhibitoren .....	47
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Identifizierung eines geeigneten Screening-Organismus .....	49
3.1.1	Die phänotypische Reaktion von potenziellen Screening-Organismen auf Tembotrion .....	49
3.1.2	Generierung einer tembotrionsensitiven <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Mutante .....	51
3.1.2.1	Wirkung von Tembotrion auf eine putative <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Mutante .....	52
3.1.3	Tembotrionaufnahme durch <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	53
3.1.3.1	Einfluss von putativen ABC-Transporterinhhibitoren auf die Tembotrionwirkung in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	54
3.1.4	Tembotrionaufnahme und Metabolisierung durch <i>P. patens</i> .....	58
3.2	Charakterisierung des gewählten Screening-Organismus <i>P. patens</i> .....	59
3.2.1	Abhängigkeit der Tembotrionwirkung von der Dichte der Starterkultur .....	60
3.2.2	Untersuchung der HPPD-Inhibitorwirkung auf verschiedene <i>P. patens</i> Gewebetypen .....	62
3.2.2.1	Die Wirkung von Diketonitril und Mesotrion auf <i>P. patens</i> .....	62
3.2.2.2	Die Wirkung von HPPD-Inhibitoren auf Gametophyten im Vergleich zu Protonema.....	64
3.2.2.3	Der Einfluss einer Erholungsphase auf die Tembotrionwirkung in regenerierenden Protoplasten .....	65
3.2.3	Charakterisierung der endogenen <i>P. patens</i> -Gene <i>PpHpd1</i> und <i>PpHpd2</i> .....	68



## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.3.1	Heterologe Expression von HPPD1 und HPPD2.....	69
3.2.3.2	Die Aktivität von HPPD1 und HPPD2 mit und ohne HPPD-Inhibitoren.....	70
3.3	Der Funktionsbeweis: Expression von HPPD-Proteinen in <i>P. patens</i> und die Auswirkung auf die HPPD-Inhibitortoleranz .....	72
3.3.1	Herstellung transgener Moospflanzen.....	72
3.3.1.1	Generierung der <i>Hpd</i> -Transformationsvektoren .....	73
3.3.1.2	Transformation von <i>P. patens</i> zur Integration und Expression von <i>Hpd</i> -Genen.....	75
3.3.1.2.1	Molekulare Verifikation der Genintegration in ausgewählten transgenen <i>Hpd</i> -Linien .....	77
3.3.1.2.2	Nachweis der HPPD-Expression in ausgewählten transgenen Mooslinien .....	78
3.3.1.3	Die Wirkung von HPPD-Inhibitoren auf transgene <i>Hpd</i> -Mooslinien.....	80
3.3.1.3.1	Toleranzsteigerung in ausgewählten <i>Hpd</i> -transgenen Linien gegenüber Tembotrion.....	80
3.3.1.3.2	Toleranzsteigerung in ausgewählten <i>Hpd</i> -transgenen Linien gegenüber Diketonitril und Mesotrion .....	84
3.4	Simulierung eines Screens: Multiple Integration mehrerer <i>Hpd</i> -Gene.....	87
3.4.1	Charakterisierung von <i>Hpd</i> -transgenen Linien aus Co-Transformation.....	88
4	Diskussion.....	93
4.1	Die Wahl eines geeigneten Organismus für das neue Screening-System.....	93
4.1.1	Die Eignung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als Screening-Organismus .....	95
4.1.1.1	Optimierungsansätze zur Nutzung von <i>C. reinhardtii</i> als Screening-Organismus .....	97
4.1.2	<i>Physcomitrella patens</i> : ein vielversprechender Screening-Kandidat.....	100
4.2	Der Funktionsbeweis für das Screening-System mit <i>P. patens</i> .....	103
4.2.1	Die Integration von <i>Hpd</i> -Genen in <i>P. patens</i> .....	103
4.2.1.1	Tembotrion als Selektionsmittel .....	106
4.2.2	Die Expression von HPPD-Proteinen in <i>P. patens</i> erhöht die Toleranz gegenüber HPPD-Inhibitoren .....	107
4.3	Simulierung eines Screens zur Identifizierung und Evaluierung HPPD-Inhibitor toleranter HPPD-Proteine.....	109
4.4	Zeitlicher Ablauf eines Screens zur Identifizierung neuer HPPD-Inhibitor toleranter HPPD-Proteine.....	112
4.5	Fazit und Ausblick .....	114
5	Literaturverzeichnis.....	117
6	Anhang .....	133
6.1	Besondere verwendete Geräte.....	133
6.2	Besondere Verbrauchsmaterialien .....	133



## Inhaltsverzeichnis

---

6.3	Verwendete Kits .....	133
6.4	Verwendete Oligonukleotide .....	134
6.5	Molekulare Verifikation der <i>Hpd</i> -Integration in ausgewählten transgenen <i>Hpd</i> -transgenen Linien .....	135
6.6	ED <sub>50</sub> -Bestimmung von multiplen <i>Hpd</i> -transgenen Linien aus Co-Transformation ..	138
	Eidesstattliche Versicherung .....	141
	Danksagung .....	143
	Lebenslauf .....	145